

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 2月14日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-037115

[ ST.10/C ]:

[ JP2001-037115 ]

出 願 人

Applicant(s):

シスメックス株式会社



2002年 1月18日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造

出証番号 出証特2002-3000165

【書類名】 特許願

【整理番号】 PTM-9706

【提出日】 平成13年 2月14日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/58

【発明の名称】 細胞周期調節因子の活性の測定法とそれを用いた癌の診断法

【請求項の数】 9

【発明者】

    【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内

    【氏名】 石原 英幹

【発明者】

    【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内

    【氏名】 吉田 智一

【発明者】

    【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内

    【氏名】 山崎 正稔

【発明者】

    【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内

    【氏名】 多田 幸代

【特許出願人】

    【識別番号】 390014960

    【氏名又は名称】 シスメックス株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100065248

【弁理士】

【氏名又は名称】 野河 信太郎

【電話番号】 06-6365-0718

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 014203

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9800839

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞周期調節因子の活性の測定法とそれを用いた癌の診断法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 生体細胞からサイクリン依存性キナーゼ／サイクリン複合体を含有する試料を調製し、

該試料の存在下、基質蛋白質のセリンまたはスレオニン残基に、アデノシン 5'- $\text{O}$ -(3-チオトリホスフェート) (ATP- $\gamma$ S) を作用させてモノチオリン酸基を導入し、

そのチオリン酸基の硫黄原子を標識蛍光物質または標識酵素で標識化し、

該基質蛋白質を標識化した標識蛍光物質からの蛍光量を測定するか、または該基質蛋白質を標識化した標識酵素に、該標識酵素との反応によって光学的に検出可能な物質が生じるような基質を作用させて、生じた生成物の量を光学的に測定し、

予め作製した検量線をもとにサイクリン依存性キナーゼの活性値を算出することを特徴とする細胞周期調節因子の活性の測定法。

【請求項 2】 該複合体のサイクリン依存性キナーゼが、CDK 1、CDK 2、CDK 4 および CDK 6 から選択される請求項 1 に記載の測定法。

【請求項 3】 該標識蛍光物質が、蛍光色素である請求項 1 に記載の測定法。

【請求項 4】 該蛍光色素が、FITC である請求項 3 に記載の測定法。

【請求項 5】 該標識酵素が、ペルオキシダーゼである請求項 1 に記載の測定法。

【請求項 6】 該複合体のサイクリン依存性キナーゼが CDK 1 または CDK 2 であり、該基質蛋白質がヒストン H 1 である請求項 1 ～ 5 のいずれか一つに記載の測定法。

【請求項 7】 該複合体のサイクリン依存性キナーゼが CDK 4 または CDK 6 であり、該基質蛋白質が、システイン残基をアラニンに置換した R b である請求項 1 ～ 5 のいずれか一つに記載の測定法。

【請求項 8】 請求項 1 に記載の方法により測定し、得られた結果に基づい

て癌を診断する方法。

【請求項 9】 癌が、胃癌、大腸癌、乳癌、肺癌、食道癌、前立腺癌、肝癌、腎臓癌、膀胱癌、皮膚癌、子宮癌、脳腫瘍、骨肉種または骨髄腫瘍である請求項 8 の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は放射性物質を用いることのない細胞周期調節因子の活性の測定法とそれを用いた癌の診断法に関する。

【0002】

【従来の技術】

細胞増殖は生物の基本的かつ重要な特徴の一つである。細胞増殖は、1つの細胞が2つの娘細胞に分裂することにより行われるが、体細胞分裂の場合、細胞の成長、DNAの複製、染色体の分配、細胞の分裂などからなる複数の連続反応により、細胞分裂が起こっている。この連続反応の一連過程は細胞周期と呼ばれる。細胞周期は、真核細胞の場合、4つの時期に分けられる。すなわち、DNA複製が起こるS期、細胞の分裂が起こるM期、M期と次のS期までの間の間隙であるG1期およびS期と次のM期までの間の間隙であるG2期からなる。G1期は細胞が増殖へのシグナルを受け、DNA複製の準備や細胞の分裂に必要な代謝、成長のための時期であり、G2期は分裂に入る準備のための時期と考えられている。また、G1期には哺乳類細胞ではR点(Restriction point)、酵母ではSTARTと呼ばれる移行点の実験的に想定されている。一般に細胞は外界からの増殖シグナルを受けて増殖する。これらのシグナルを細胞はG1期で受け取り、細胞周期を進行させるが、G1期のある点を過ぎると細胞は増殖シグナルがなくなっても、増殖を停止することなくS→G2→M→G1と細胞周期を進行させる。この点がR点またはSTARTであり、いわば細胞が増殖方向に進行することを決定する時期であるといえる。さらに、細胞は細胞周期を逸脱し、成長も増殖もしない休止期(G0期)に入ることができる。実験的にはこのような細胞は適当なシグナルを与えればG1期に戻り、成長と分裂を再び誘導

することができる。多細胞生物体を構成する多くの非成長性、非増殖性の細胞は G0 期にあると考えられている。

## 【0003】

細胞内にあって、細胞周期調節因子は主に2つ存在する。1つは、正の調節因子であるサイクリン依存性キナーゼ（CDK）と呼ばれるリン酸化酵素群であり、もう一つは負の調節因子であるCDK阻害因子（CDKI）である。CDKは、通常細胞内では不活性型単体として細胞質に存在し、CDK自体がリン酸化等の活性化を受けて細胞内の核内に移動する。核内では、CDKは核内に存在するサイクリン分子と結合してCDKとサイクリンの複合体（以下、活性型CDKと称する）となり、細胞周期の様々な段階において、細胞周期の進行を正に調節する。一方、CDKIはCDKと結合することにより、すなわちCDKIが活性型CDKまたはCDK単体と結合することによりCDKを不活性とし、細胞周期活性を負に調節する。

## 【0004】

CDKは、現在、CDK1、2、3、4、5、6および7のタイプが知られ、それぞれ結合するサイクリンが異なる。すなわち、CDK1はサイクリンAまたはBと、CDK2はサイクリンAまたはEと、CDK4およびCDK6はサイクリンD1、D2またはD3と結合して活性型となる。活性型CDKは、それぞれ特異的な細胞周期の段階を制御する。細胞周期制御にかかわるCDKと、機能的に結合するサイクリンおよびこれら活性型CDKが機能する段階を以下の表1に示す。

## 【0005】

【表1】

CDK	結合するサイクリン	活性型CDKが機能する細胞周期の段階
CDK4、CDK6	サイクリンD1、D2、D3	G1
CDK2	サイクリンE	G1→S移行
CDK2	サイクリンA	S
CDK1	サイクリンA、B	G2→M移行、M

## 【0006】

このように、異なる種類のCDKが活性化されることにより細胞周期が調節され、細胞増殖を調節している。活性型CDKは基質蛋白質のセリンまたはスレオニン残基をリン酸化する酵素である。in vitro反応系においては、活性型CDK1および2はヒストンH1を、活性型CDK4および6はRb（網膜芽細胞腫蛋白質、Retinoblastoma protein）を基質として良好に反応を行う。しかし、実際の細胞周期制御における各活性型CDKの生理的基質は、その一つがRbであると考えられているが、これ以外に基質が存在するかどうかは未だ不明である（田矢洋一編集、「わかる細胞周期と癌」、羊土社、20～27頁）。

## 【0007】

上記のように、CDKおよびサイクリンは密接に関連しあって細胞周期を調節しているが、食道癌ではサイクリンD1遺伝子の増幅が多く症例において認められ、胃癌や大腸癌ではサイクリンD1遺伝子の発現亢進が多く症例において示されている。一方、サイクリンEの遺伝子の増幅は胃癌や大腸癌で認められているが、食道癌では認められていない。胃および大腸でのサイクリンEの過剰発現は、腺腫および腺癌の場合に有意に高頻度であり、深部への湿潤、ステージの進行、転移などの悪性度と有意な相関を示す。また、CDK1の発現およびキナーゼ活性は、正常粘膜組織においてと比較して大部分の胃癌および大腸癌において著しく亢進している。従って、サイクリン遺伝子の発現の減弱と、種々の癌の進行度や悪性度と相関していることが知られている（安井 弥、Sysmex Journal Web., 1～10頁, vol. 1, 2000）。

## 【0008】

以上のことから、それぞれの種類のCDKの活性を測定すると、細胞周期の制御に関連した疾患の種類や悪性度の良い指標となり得ることが期待される。すなわち、R点でCDK2の発現が低下し細胞周期を停止させて細胞分裂が調節されるが、CDK2の発現が高まっていることはR点における細胞周期の停止不能、例えば癌のような疾患の状態を意味すると予想される。また、CDK4または6の発現が高まっていることから、CDK4または6と特異的に結合するサイクリ

ンD1遺伝子の発現亢進が見られる胃癌または大腸癌が予想され、癌の種類を決定することが可能であると考えられる。

【0009】

通常、CDKの活性は放射性同位体を用いて測定される。詳細には、抗CDK抗体を用い細胞溶解液から免疫沈降法により抽出された活性の不明なCDK存在下に、基質蛋白質のセリンまたはスレオニン残基に、 $^{32}\text{P}$ 標識化したアデノシン5'-O-(3-トリホスフェート)(ATP)を作用させて、 $^{32}\text{P}$ 標識化したATP由来のモノリン酸基を導入し、基質蛋白質に取り込まれた $^{32}\text{P}$ 量をオートラジオグラフィーまたはシンチレーションカウンターで検出することによりリン酸化された基質蛋白質の量が測定され、その基質蛋白質の量からCDKの活性が算出される。

上記の方法は、 $^{32}\text{P}$ という放射性物質を使用するため、取り扱いや廃液処理等には注意が必要である。

【0010】

【解決しようとする課題】

従って、放射性物質を使用せずに鋭敏に細胞周期調節因子を測定する方法およびその結果に基づいて癌を診断する方法を見出すことが、所望されていた。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明は、生体細胞からサイクリン依存性キナーゼ/サイクリン複合体を含有する試料を調製し、該試料の存在下、基質蛋白質のセリンまたはスレオニン残基に、アデノシン5'-O-(3-チオトリホスフェート)(ATP- $\gamma$ S)を作用させてモノチオリン酸基を導入し、そのチオリン酸基の硫黄原子を標識蛍光物質または標識酵素で標識化し、該基質蛋白質を標識化した標識蛍光物質からの蛍光量を測定するか、または該基質蛋白質を標識化した標識酵素に、該標識酵素との反応によって光学的に検出可能な物質が生じるような基質を作用させて、生じた生成物の量を光学的に測定し、予め作製した検量線をもとにサイクリン依存性キナーゼの活性値を算出することを特徴とする細胞周期調節因子の活性の測定法を提供するものである。



さらに、本発明は本発明の細胞周期調節因子の活性の測定法により得られた結果に基づいて、癌を診断する方法を提供する。

【 0 0 1 2 】

【発明の実施の形態】

本発明の方法を実施するには、測定試料を調製する必要がある。

本発明の方法で用いる生体細胞から分離された活性型CDKを含有する試料は、生体細胞の可溶化およびその可溶化液からの活性型CDKの単離工程により調製される。

本発明で用いられるCDKとは、CDK1、CDK2、CDK3、CDK4、CDK5、CDK6およびCDK7が挙げられる。

【 0 0 1 3 】

(1) 細胞の可溶化

試料は、組織サンプル（バイオプシーサンプルや外科切除サンプル等）のようなヒトを含む動物由来の生体細胞から調製する。単体CDKは細胞質に存在し、核内でサイクリンと結合して活性型CDKとなるため、細胞を可溶化させて活性型CDKを取り出す必要がある。

従って、まず、界面活性剤、蛋白質分解酵素阻害剤および脱リン酸化酵素阻害剤を含有する緩衝液中で、ワーリングブレンダーや超音波を使用して生体細胞を粉砕して可溶化される。

【 0 0 1 4 】

界面活性剤は、細胞膜や核膜を破壊して細胞内物質を取り出し、可溶化された細胞を調製するために用いる。ただし、活性型CDKを分解させない程度の界面活性性を有するものを用いる。その例としては、ノニデットP-40、トリトンX-100、デオキシコール酸、CHAPSが挙げられる。界面活性剤濃度は、1w/v%以下が好ましい。

【 0 0 1 5 】

蛋白質分解酵素阻害剤は、細胞膜や核膜が破壊された細胞内物質が混在するときに蛋白質であるCDKやサイクリン分子が破壊されるのを防ぐために用いる。その例は、EDTA、EGTAのようなメタロプロテアーゼ阻害剤、PMSF、

トリプシンインヒビター、キモトリプシンのようなセリンプロテアーゼ阻害剤および／またはヨードアセトアミド、E-64のようなシステインプロテアーゼ阻害剤の混合物や、シグマ社から市販のプロテアーゼ阻害剤カクテルのようなそれら蛋白質分解酵素阻害剤の予め混合された市販品が挙げられる。

## 【0016】

脱リン酸化酵素阻害剤は、蛋白質である活性型CDK自体のリン酸基が水解されて活性が変動するのを防ぐために用いる。その例として、セリン／スレオニン脱リン酸化酵素阻害剤としてはフッ化ナトリウムが、チロシン脱リン酸化酵素阻害剤としてはオルトバナジン酸ナトリウム ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) が挙げられる。

## 【0017】

細胞を可溶化した後、生体細胞の溶解液から遠心分離やフィルターを用いたろ過などにより不溶物を除去する。次に、活性型CDKを単離するにあたり、処理された生体細胞の溶解液中の全蛋白質量を当業者に公知の方法に従って測定しておくのが望ましい。全蛋白質量は、例えば、DC蛋白質キット等を用いて、ウシIgGを標準として測定される。

## 【0018】

## (2) 活性型CDKの単離

生体細胞の溶解液から、その活性を測定する目的の活性型CDKを単離する。

活性型CDKの単離法は、例えば、免疫沈降法がある。

免疫沈降法によれば、各種CDK 1～7のいずれか一つに特異性を有する抗CDK抗体が用いられる。

## 【0019】

より詳細には、所定量の蛋白質を含む調製試料に抗CDK抗体と、抗CDK抗体を捕捉するための材料としてプロテインA、プロテインGまたは抗ウサギIgG抗体をコートしたセファロースビーズの懸濁液（ビーズ含量4～6 v/v%）を0～10℃で1～2時間反応させる。これらビーズは不溶性なので、ビーズに結合した抗CDK抗体とCDKの複合体は不溶性となり沈降する。

## 【0020】

なお、免疫沈降法によると、試料中のCDK群（CDK単体、活性型CDK、

活性型CDKとCDK Iの複合体、およびCDKとCDK Iの複合体を意味する)をすべて捕捉するので、活性型CDKと共にCDK単体、活性型CDKとCDK Iの複合体、およびCDKとCDK Iの複合体のような不活性型CDKも単離される。しかし、不活性型CDKはATP- $\gamma$ S存在下に基質蛋白質のモノチオリン酸化に関与しないので、不活性型CDKを含む活性型CDKの活性測定用試料を用いて本発明の方法を実施しても、不活性型CDKの活性は測定されず、活性型CDKの活性のみが測定されることとなる。

## 【0021】

次いで、沈降した活性型CDKと抗CDK抗体との複合体と結合したビーズを洗浄してビーズを洗浄する。ビーズを洗浄する洗浄用緩衝液には、後に基質蛋白質と活性型CDKにATP- $\gamma$ Sが作用するためにマグネシウムとコンプレックスを形成する必要があるので塩化マグネシウム、およびタンパクの高次構造の安定化のために必要な酵素の安定化剤として例えばジチオスレイトール(DTT)を含む。さらに、アルブミンや、少量の界面活性剤などを含んでもよい。

## 【0022】

その後、単離した活性型CDKを用いて、その活性を測定する。本発明による方法は、活性型CDK存在下に基質蛋白質のセリンまたはスレオニン残基をモノチオリン酸化することと、そのチオリン酸基を標識化してその標識を測定することからなる。なお、本発明の方法においては、ビーズに結合したCDK抗体と結合した状態の活性型CDK抗体を、活性型CDKとして用いて行ってもよい。

## 【0023】

(i) 活性型CDK存在下に基質蛋白質のセリンまたはスレオニン残基をモノチオリン酸化すること

従って、活性型CDK存在下に、基質蛋白質のセリンまたはスレオニン残基に、アデノシン5'-O-(3-チオトリホスフェート)(ATP- $\gamma$ S)を作用させてATP- $\gamma$ S由来のモノチオリン酸基を導入する。

通常、活性型CDKは、以下の式に示すように、基質蛋白質のセリンまたはスレオニン残基にATPを作用させてATP由来のモノリン酸基を導入するが、本発明の方法においては、ATPの代わりにATP- $\gamma$ Sを用いて、モノリン酸基

の代わりにモノチオリン酸基を基質蛋白質のセリンまたはスレオニン残基に導入するものである。

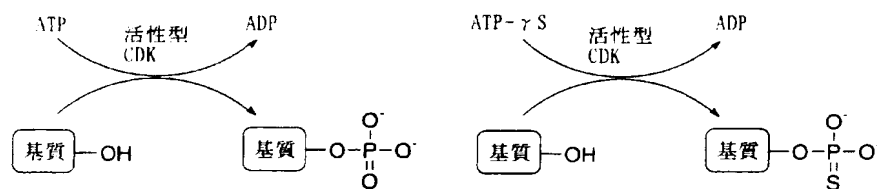
## 【 0 0 2 4 】

モノチオリン酸化するには、該基質蛋白質 0. 1 ~ 1 m g / m l を含む p H 6 . 5 ~ 8 . 5、好ましくは 7 . 4 の溶液を、2 5 ~ 4 0、好ましくは 3 7 ° C の温度で、該基質蛋白質 1 等量に対して 1 0 ~ 1 0 0 等量の A T P - γ S と、活性型 C D K とを、5 分間 ~ 1 時間、好ましくは 1 0 分間反応させることにより行う。

単離した活性型 C D K には上述のように不活性型も含まれているが、活性型 C D K のみがチオリン酸基導入反応を触媒するので、本発明の方法には不活性型は関与しない。

## 【 0 0 2 5 】

## 【化 1】



基質蛋白質としては、活性型 C D K 1 および C D K 2 に対してはヒストン H 1、活性型 C D K 4 および C D K 6 に対しては R b (網膜芽細胞腫蛋白質、Retinoblastoma protein) などが挙げられる。

## 【 0 0 2 6 】

なお、本発明において、元来分子内にシステイン残基を含む基質蛋白質、例えば R b については、その残基をアラニンなどのチオール基を含まないアミノ酸残基に置換した基質蛋白質を用いる。これは、活性型 C D K の作用により A T P - γ S 由来のチオリン酸基が導入された基質蛋白質のチオリン酸の硫黄原子を標識蛍光物質または標識酵素で標識化する際に、基質蛋白質内に元来存在するシステイン残基のチオール基が同時に標識化されて測定誤差が生じないようにするためである。

## 【 0 0 2 7 】

元来分子内にシステイン残基を含む基質蛋白質について、その残基をアラニン

などのチオール残基を含まないアミノ酸残基に置換した基質蛋白質を製造する方法としては、PCR法、部位点突然変異法による基質蛋白質遺伝子の修飾およびその遺伝子の発現が挙げられる。具体的には、例えば、Rbのようなシステイン残基を含む基質蛋白質には、オリゴヌクレオチドプライマーRb-1 (5' - A C A G G A T C C T T G C A G T A T G C T T C C - 3' )、Rb-2 (5' G C T G T T A G C T A C C A T C T G A T T T A T - 3' )、Rb-3 (5' - A T G G T A G C T A A C A G C G A C C G T G T G - 3' ) およびRb-7 (5' - G C G A A T T C A A T C C A T G C T A T C A T T - 3' ) を用いてクローニングすることにより得られる組換えベクターから発現して得られる、システイン残基をコードするヌクレオチドをアラニン残基をコードするヌクレオチドに置換した組換えDNAを発現させてシステイン残基をアラニン残基に置換した基質蛋白質を製造する。

## 【0028】

( i i ) 該基質蛋白質に導入されたチオリン酸基の標識化およびその標識の量の測定

該基質蛋白質に導入されたチオリン酸基の硫黄原子を標識蛍光物質または標識酵素で標識化するには、チオリン酸基を導入した該基質蛋白質0.1~1mg/mlを含むpH7.5~9.0、好ましくは8.5の溶液を、該基質蛋白質1等量に対して10~100等量の、チオール基と反応する官能基を持つ標識蛍光物質または標識酵素と10分~2時間反応させることにより行う。反応は、遊離のチオール、例えば $\beta$ -ME ( $\beta$ -メルカプトエタノール)、DTT (ジチオスレイトール) を添加して停止される。

## 【0029】

該基質蛋白質に導入されたチオリン酸基の硫黄原子を標識蛍光物質または標識酵素で標識化する。標識蛍光物質で標識化した該基質蛋白質の場合、該標識蛍光物質からの蛍光量を測定し、予め作製したチオリン酸基を導入した既知量の基質蛋白質と蛍光量との検量線に、得られた蛍光量をあてはめることにより該標識蛍光物質の量を算出する。その該標識蛍光物質を、試料中に含まれる活性型CDK

の活性値とする。または、標識酵素で標識化した該基質蛋白質の場合、該基質蛋白質を標識化した標識酵素に、該標識酵素との反応によって光学的に検出可能な物質が生じるような基質を作用させて、生じた生成物の量を光学的に測定し、前記と同様に予め作製した検量線に得られた測定値をあてはめることにより試料中に含まれる活性型CDKの活性値を算出する。ここで、光学的に検出可能な物質とは、蛍光や吸光度等を測定することによってその存在を検出できるような物質をいう。

## 【 0 0 3 0 】

チオリン酸基の硫黄原子を標識化するための標識蛍光物質としては、フルオレセイン、クマリン、エオシン、フェナントロリン、ピレン、ローダミンなどが挙げられる。そのうち、フルオレセインが好ましい。これらの標識蛍光物質によりチオリン酸基の硫黄原子を標識化するためには、チオール基と反応する官能基を持つ標識蛍光物質、例えばアルキルハライド、マレイミド、アジリジン部位を有する標識蛍光物質が使用される。

## 【 0 0 3 1 】

チオール基と反応する官能基を持つ標識蛍光物質としては、ヨードアセチル-FITC（フルオレセインイソチオシアネート）、5-（ブロモメチル）フルオレセイン、フルオレセイン-5-マレイミド、5-ヨードアセトアミドフルオレセイン（5-IAF）、6-ヨードアセトアミドフルオレセイン（6-IAF）、4-ブロモメチル-7-メトキシクマリン、エオシン-5-ヨードアセトアミド、エオシン-5-マレイミド、エオシン-5-ヨードアセトアミド、N-（1, 10-フェナントロリン-5-イル）ブロモアセトアミド、1-ピレンブチルクロリド、N-（1-ピレンエチル）ヨードアセトアミド、N-（1-ピレンメチル）ヨードアセトアミド（PMIA アミド）、1-ピレンメチルヨードアセテート（PMIA エステル）、ローダミンレッドC<sub>2</sub>マレンイミドなどが挙げられる。このうち、ヨードアセチル-FITCが好ましい。

## 【 0 0 3 2 】

また、チオリン酸基の硫黄原子と反応する官能基を有するビオチン、例えばヨードアセチルビオチンと反応させた後に、ビオチンとアビジンの親和性を利用し

てアビジンに標識蛍光物質が共有結合した分子を反応させて、チオリン酸基の硫黄原子に標識蛍光物質を導入してもよい。

チオリン酸基の硫黄原子に標識酵素を導入する方法としては、ヨードアセチルビオチンを硫黄原子に導入し、その後該ビオチン分子に親和性を持つアビジン分子に酵素が共有結合した分子を反応させることによる方法がある。酵素としては、 $\beta$ ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼが挙げられる。そのうち、ペルオキシダーゼが好ましい。

#### 【0033】

標識化された該基質蛋白質の量の測定方法としては、標識蛍光物質からの蛍光量を測定するか、または標識酵素で標識化された該基質蛋白質に、該標識酵素との反応によって光学的に検出可能な物質が生じるような基質を作用させて、生じた生成物を光学的に測定する方法がある。

具体的には、標識蛍光物質を用いる場合、標識蛍光物質をある特定の波長で励起させて、蛍光画像解析装置で検出する。照射する光の波長は標識蛍光物質によって異なるが、具体的には、標識蛍光物質が、フルオレセインであるときは488 nmの波長を照射して励起させる。

#### 【0034】

標識酵素を用いる場合、標識酵素で標識化された該基質蛋白質に、該標識酵素との反応によって蛍光物質が生じるような基質を加えて、該標識酵素との反応を起こさせて蛍光物質を生成させ、その蛍光物質を特定の蛍光波長で励起させて、蛍光を検出する。標識酵素との反応により蛍光物質を生成する物質には、標識酵素がペルオキシダーゼであるときには、蛍光物質を生成するECL-プラスが挙げられる。なお、基質は使用する酵素に合わせて適宜選択することができる。

#### 【0035】

標識蛍光物質または反応によって生成した蛍光物質の量を測定し、予め作製した検量線にあてはめて、活性型CDKの活性値を算出する。標識化された基質蛋白質の反応液は、該標識化された基質蛋白質の標識蛍光物質の蛍光量または、標識酵素との反応によって生じた発光物質の蛍光量が検量線範囲に入る程度まで希釈する必要がある。具体的には、例えば、100～500倍に希釈する。希釈剤

としては、TBS (50 mM Tris-HCl、pH 7.5、150 mM NaCl)、水、塩化ナトリウム水溶液等が用いられる。塩化ナトリウム水溶液の場合は、塩化ナトリウムの濃度が100～500 mMの範囲が好ましい。希釈した場合には、活性型CDKの活性を算出する際に希釈倍率も考慮に入れる。得られた活性型CDKの活性値は、調製した試料の全蛋白質量から取り出した所定量の蛋白質中に含まれる量である。

#### 【0036】

予め作製する検量線は、チオール基を導入した既知量の基質蛋白質を用いて作製するのが望ましいが、その他、標識蛍光物質または標識酵素との反応に対する挙動が、チオール基を導入した基質蛋白質と同様であることが知られているビオチン化アクチン等を代わりに用いてもよい。その際、活性型CDKの活性値は、ビオチン化アクチン等の量から換算される必要がある。

また、本発明は、本発明の方法により測定したCDK活性の結果により、胃癌、大腸癌、乳癌、肺癌、食道癌、前立腺癌、肝癌、腎臓癌、膀胱癌、皮膚癌、子宮癌、脳腫瘍、骨肉種または骨髄腫瘍のような癌疾患を診断する方法を提供する。

#### 【0037】

##### 【実施例】

方法例1 (活性型CDK1の測定の場合；ペルオキシダーゼ標識化を使った例)

##### 第1工程：

0.1 w/v % NP40 (界面活性剤ノニデットP-40)、50 mMのトリス-HCl、pH 7.4、5 mM EDTA、50 mMのフッ化ナトリウム、1 mMのオルトバナジン酸ナトリウムおよび100  $\mu$ l/mlのプロテアーゼ阻害剤カクテル (シグマ、SIGMA社) を含む溶解緩衝液中で、 $1 \times 10^7$  細胞/5 ml の溶解緩衝液という条件下にHeLa (子宮頸部癌細胞) 細胞を、氷浴中で23 G針をつけた5 mlのシリンジで10回吸引排出を繰り返し、細胞溶解液を調製した。不溶物を15000 rpmで5分間4℃で遠心除去した。上澄み中に含まれる全蛋白質量をDC蛋白質キット (バイオラッド、Bio-Ra



d社)を用いて、ウシIgGを標準として測定した。

【0038】

第2工程:

1. 5ml用量のエッペンドルフチューブに、500 $\mu$ lの溶解緩衝液中に溶解物の全蛋白質量が10 $\mu$ gとなる量を加え、サンプルを調製した。サンプルに、10 $\mu$ lのポリクローナル抗CDK抗体(サンタクルツバイオテクノロジー、Santa Cruz Biotechnology社)を加えた。そのサンプルに、60 $\mu$ lのプロテインAをコートしたセファロースビーズ(最終的には30 $\mu$ lの封入されたビーズ)の1:1(セファロビーズ:溶解緩衝液)スラリーを加えた。サンプルを、1時間4℃で連続的に回転させてインキュベートした。サンプル中のビーズを1mlの溶解緩衝液で2回洗浄した。そのビーズを、50mMのトリス-HCl、pH7.4、10mMの塩化マグネシウム(MgCl<sub>2</sub>)、1mMのDTTを含むキナーゼ緩衝液1mlで1度洗浄した。ビーズを15 $\mu$ lのキナーゼ緩衝液中に再懸濁させた。

【0039】

第3工程:

懸濁液に、ヒストンH1溶液(50mMのトリス-HCl、pH7.4中の0.1mg/mlの溶液)を10 $\mu$ l加えた。その懸濁液にATP- $\gamma$ S溶液(10mM水溶液)を10 $\mu$ l加えた。懸濁液を10分間37℃で連続的に振とうしながらインキュベートした。10000rpmで10秒間ビーズを遠心し、沈殿させた。30 $\mu$ lの上澄み液を集めた。上澄み液に、ヨードアセチルビオチンとチオリン酸の結合反応の至適条件がpH8.5であるため、150mMのトリス-HClおよびpH9.2、5mMのEDTAを含む結合用緩衝液25 $\mu$ lを加えた。上澄み液に、40mM PEO-ヨードアセチルビオチン(Pierce社)溶液(20mMのリン酸緩衝液pH6.0)を20 $\mu$ l加えた。上澄み液を90分間暗所室温でインキュベートした。ヨードアセチルビオチンとの反応を、7.5 $\mu$ lの $\beta$ -ME( $\beta$ -メルカプトエタノール)を加えて停止させた。反応液を、TBS(50mMのトリス-HCl、pH7.4、150mM 塩化ナトリウム)で希釈した。

【0040】

第4工程

希釈した反応液の50  $\mu$ lをスロットブロッター (Slot Blotter) を用いてPVDFメンブレン上に添加し吸引した。メンブレンを50mlのTBS-T (0.05w/v% Tween 20を含むTBS溶液) で1度洗浄した。メンブレンがアビジン-ペルオキシダーゼと反応しないように、予めメンブレンの疎水性部分をBSAによりブロックする。具体的には、メンブレンをTBS-T中で3w/v%のBSA (ウシ血清アルブミン、Bovine Serum Albumin) で30分間室温でブロックした。メンブレンをアビジン-ペルオキシダーゼ (Vector社) (TBS-Tで50000倍希釈) で10分間室温で反応させた。メンブレンを50mlのTBS-Tで3回洗浄した。ECL-プラス (Amersham社) をメンブレンに5分間反応させた; 溶液の調製は、製造者の指示に従った。メンブレンを200mlの水で洗浄して反応を停止させた。Molecular Imager (Bio-Rad社) で蛍光のバンドを視覚化し、定量した。

【0041】

方法例2 (活性型CDK1の測定の場合; FITC標識化を使った例)

上記第4工程において、アビジン-ペルオキシダーゼの代わりにアビジン-FITCを使用し、ECL-プラスを反応させない以外は方法例1と同様に操作した。

【0042】

製造例1 (Rb (網膜芽細胞腫蛋白質) のシステイン残基をアラニン残基で置換した蛋白質をコードする組換えベクターおよびそのベクターを発現したタンパクの製造)

まず、ヒトRbをコードするcDNAをヒト胎盤のcDNAライブラリー (ストラタジーン (STRATAGENE) 社) よりクローニングした。

Cys 853をAlaに単一変異させた、ヒトのRbのC-末端部分 (Leu 769からLys 928) を発現するプラスミドを構築するためには、2工程のPCRを、ヒトRb cDNAの全長を含むpJ3 $\Omega$ ベクターで、オリゴヌクレ

オチドプライマーを用いて行った。

【0043】

まず、ヒトRbタンパクのLeu769からAsp921に相当する領域を増幅し、同時に、Cys853をAlaに変換するために、4種類のプライマーを用いて2段階PCRを行った。用いたプライマーは、両端のプライマーRb-1 (5' -ACA GGA TCC TTG CAG TAT GCT TCC-3'、BamHI部位(下線部)を導入) およびRb-7 (5' -GCG AA T TCA ATC CAT GCT ATC ATT-3'、EcoRI部位(下線部)を導入)に加えて、853位をAlaコドン(AGC)に変換したプライマーRb-2 (5' -GCT GTT AGC TAC CAT CTG ATT TAT-3'、突然変異コドンを下線で示した)とその相補的プライマーRb-3 (5' -ATG GTA GCT AAC AGC GAC CGT GTG-3')である。ヒトRb全長cDNAを鋳型として、プライマーセットRb-1/Rb-2とプライマーセットRb-3/Rb-7によりそれぞれPCRを行った。それぞれのPCR産物は、プライマーRb-2とRb-3に対応する領域で相補的である。PCR産物のA-3'突出部(overhang)をクレノウ(Klenow)で処理した後、それらのPCR産物の混合物を鋳型として、両端のプライマーセットRb-1/Rb-7によりPCRを行い、Cys853Alaを持つLeu769からAsp921に相当する470bpのDNA断片を増幅した。

【0044】

つぎに、RbタンパクのN末端に分泌シグナル配列を付加するために、470bpのDNA断片をpMelBacA(Invitrogen社)のBamHIとEcoRI部位にサブクローニングした。そのプラスミドを鋳型として、プライマーRb-9 (5' -GCG AAT TCA TGA AAT TCT T AG TCA-3'、EcoRI部位(下線部)を導入)とRb-5 (5' -G TT CTC GAG TCA ATC CAT GCT ATC ATT-3'、XhoI部位(下線部)を導入)を用いてPCRを行い、分泌シグナルを付加した540bp DNA断片を増幅した。

## 【0045】

Bac-to Bacシステム (Lifetech社) により組換えウイルスを単離するために、製造例1で得られたDNA断片をpFastBac1 (Lifetech社) のEcoRIとXhoI部位にクローニングし、発現プラスミドとした。その後、昆虫細胞の培養液中で、昆虫細胞に感染させることにより、発現した組換えタンパクを培地中に分泌、発現させた。次いで、Q Sepharose (ファルマシア、Pharmacia社) を用いたイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。

得られた蛋白質は、CDK4またはCDK6の測定を行う場合に、方法1において第3工程の基質蛋白質であるヒストンH1の代わりに用いる。

## 【0046】

活性型CDK活性の測定

## 1. ビオチン化アクチン (BA) を標準物質とした検量線作成

BA濃度0~1000 ng/mlの濃度系列の試料を調製し、各50  $\mu$ lをスロットに注入する。スロット中の試料は方法例1の第4工程の処理を行う。BAはペルオキシダーゼで標識化されているので第4工程においてECL-プラス (蛍光基質) から蛍光物質を生成する。各BA濃度の試料の蛍光物質の蛍光量を測定し、その蛍光量をカウント (CNT) 値で表示する。BA濃度を横軸に、CNT値を縦軸にとり、データをプロットし、方法例1の反応条件下での検量線を作成する。得られた検量線は図1に示す。

## 【0047】

同様に、方法例2についても、スロット中の試料に方法例1の第4工程の処理を行い、上述のようにして方法例2の反応条件下での検量線を作成する。得られた検量線は図2に示す。

## 【0048】

## 2. 活性型CDKの活性値の算出

方法例1および2のそれぞれについて、抗CDK抗体を添加しない以外は方法例1に従って処理した試料をブランク試料として調製する。そのブランク試料の蛍光量を測定し、得られたCNT値をそれぞれの方法例に対応する上記で作成し

た検量線を用いて B A 濃度に換算する。得られた B A 濃度を以下の式に代入して活性型 C D K の活性値を算出する。

式 1 : { ( 試料の B A 換算濃度 ) - ( ブランク試料の B A 換算濃度 ) } × ( 試料の希釈倍率 ) = ( 活性型 C D K の活性値 )

【 0 0 4 9 】

なお、作成した検量線がシグモイド曲線ではない、直線であるとき（例えば、方法例 2）は、( 試料の C N T 値 ) - ( ブランク試料の C N T 値 ) を算出し、その差を検量線を用いて B A 濃度に換算し、得られた B A 濃度を以下の式に代入して活性型 C D K の活性値を算出してもよい。

式 2 : ( 試料とブランク試料の C N T 値の差の B A 換算濃度 ) × ( 試料の希釈倍率 ) = ( 活性型 C D K の活性値 )

【 0 0 5 0 】

実施例 1 ( 方法例 1 で処理した試料の活性型 C D K 1 の活性値の測定 )

方法例 1 で抗 C D K 1 抗体を用い希釈倍率 4 5 0 倍で調製した試料の蛍光量を、前述のようにして測定した。試料 1 は増殖期にある H e L a 細胞を、試料 2 は増殖停止期にある H e L a 細胞を用いて調製した。検量線が図 1 に示されたようにシグモイド曲線であったので式 1 を用いて、すなわちブランク試料を上述のように作成し、その蛍光量を測定して、先に測定した試料の蛍光量から活性型 C D K 1 の活性値を算出した。その結果を表 2 に示す。

【 0 0 5 1 】

【表 2】

	C N T 数	活性型 C D K 1 の活性値 ( n g / スロット )
試料 1	1 4 7 . 6	6 9 2 1 . 4
試料 1 ブランク	6 8 . 7	—
試料 2	1 3 3 . 3	5 1 2 1 . 8 5
試料 2 ブランク	6 9 . 1	—

【 0 0 5 2 】

実施例 2 ( 方法例 2 で処理した試料の活性型 C D K 1 の活性値測定 )

方法例 2 で抗 C D K 1 抗体を用い希釈倍率 1 0 0 倍で調製した試料の蛍光量を、前述のようにして測定した。検量線は図 2 に示されたように直線であったので、式 1 または式 2 のいずれを用いても、活性型 C D K 1 の量は算出可能であることが判明した。

【 0 0 5 3 】

【発明の効果】

上記から示されたように、本発明の方法は、放射性物質を用いずに、細胞周期調節因子の活性を鋭敏に高感度に測定することができる。

【 0 0 5 4 】

【図面の簡単な説明】

【図 1】

実施例 1 において得られるビオチン化アクチンの量 (n g / スロット) と、蛍光量 (カウント) との関係を示す検量線である。

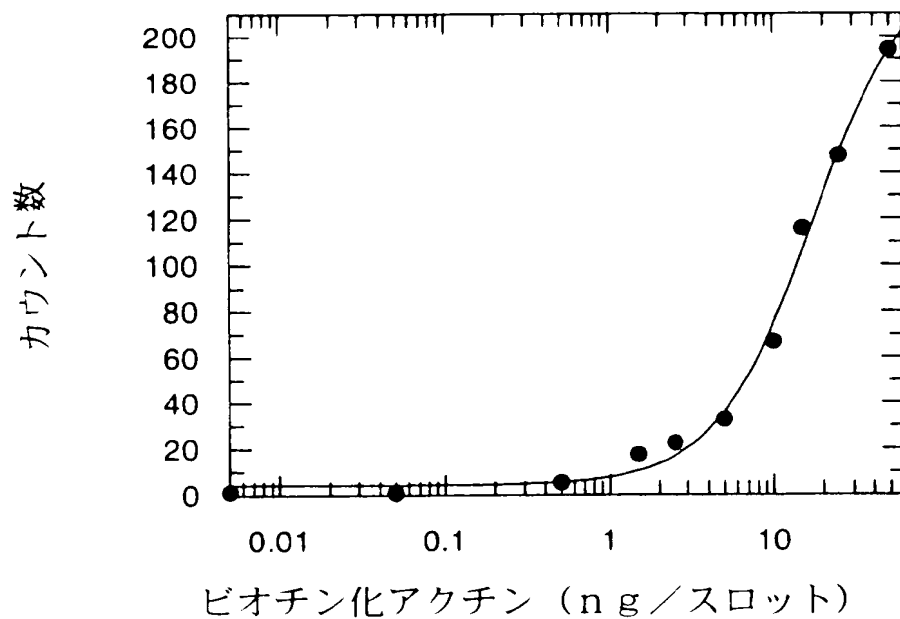
【図 2】

実施例 2 において得られるビオチン化アクチンの量 (n g / スロット) と、蛍光量 (カウント) との関係を示す検量線である。

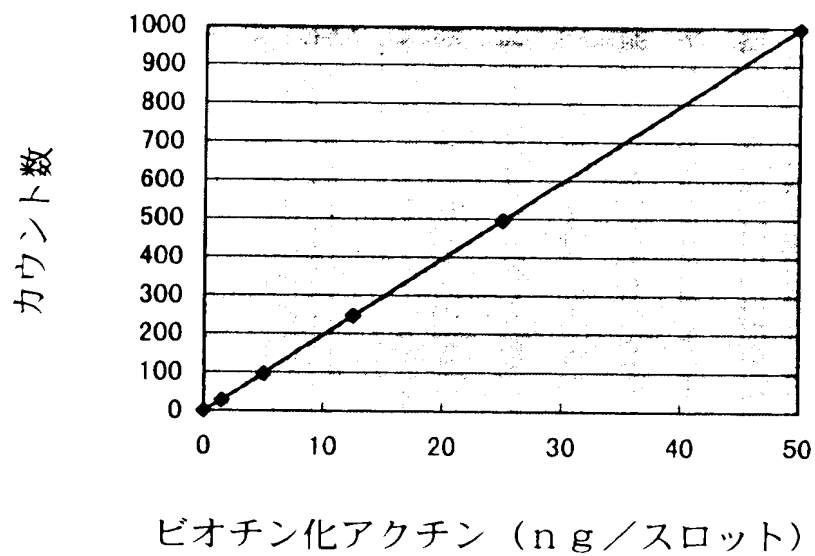
【書類名】

図面

【図1】



【図 2】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 放射性同位体を用いずに、細胞周期調節因子を測定する方法を見出すこと。

【解決手段】 生体細胞からサイクリン依存性キナーゼ／サイクリン複合体を含有する試料を調製し、該試料の存在下、基質蛋白質のセリンまたはスレオニン残基に、アデノシン 5' - O - (3 - チオトリホスフェート) (ATP- $\gamma$ S) を作用させてモノチオリン酸基を導入し、そのチオリン酸基の硫黄原子を標識蛍光物質または標識酵素で標識化し、該基質蛋白質を標識化した標識蛍光物質からの蛍光量を測定するか、または該基質蛋白質を標識化した標識酵素に、該標識酵素との反応によって光学的に検出可能な物質が生じるような基質を作用させて、生じた生成物の量を光学的に測定し、予め作製した検量線をもとにサイクリン依存性キナーゼの活性値を算出する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [390014960]

1. 変更年月日 1998年10月 7日

[変更理由] 名称変更

住 所 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号

氏 名 シスメックス株式会社